DOI：10.11931/guihaia.gxzw202311023

叶面施硒对水稻叶片亚细胞组分中硒分布和累积的影响

孙剑平[1]，鲁佳妮[1,2]，李晓军[2*]，薛晨阳[2]

（1.沈阳建筑大学市政与环境工程学院，沈阳，110168；2.中国科学院沈阳应用生态研究所，中国科学院污染生态与环境工程重点实验室，沈阳，110016）

摘要：叶面喷硒是一种有效提高作物硒含量的农艺强化手段。探究硒在水稻叶片组分中的分布、积累特征及影响因子，可为提高叶施硒的利用效率，减少硒的生态环境风险提供支撑。该研究利用叶片离体培养技术，比较了不同硒形态、浓度、处理时间及不同表面活性剂载体对水稻叶片亚细胞组分中硒的分布和累积的影响。结果表明：（1）硒主要分布在水稻叶片细胞壁中，其次是叶绿体和线粒体组分，细胞液最少；（2）叶施硒肥数小时内叶片对亚硒酸钠的吸收能力显著高于纳米硒、硒代蛋氨酸和酵母硒，分别高出 1.25 倍、1.32 倍和 5.43 倍，迁移能力高出其余三者约 1.26 倍；（3)水稻每片叶片的最佳施硒量为 0.008 mg，此时叶绿体和线粒体中硒含量达到最大值；（4）叶施硒后 3~7 h 是叶片吸收转运硒的关键时间点；（5）同时相比于环糊精和烷基糖苷，在外源硒中添加浓度为 30 mg·L^{-1}的鼠李糖脂可以更好的促进水稻叶片对硒的吸收，吸收含量增加 0.8 倍。综上结果为后续了解硒在叶片中的迁移机制奠定基础，也为未来硒配方优化、科学施硒制度建立以及降低硒生态环境风险提供支撑。

关键词：硒，水稻，亚细胞分布，叶施，表面活性剂

中图分类号：Q945　　　　**文献标志码**：A　　　文章编号：

Effects of foliar-sprayed of selenium on distribution and accumulation of selenium in subcellular components of rice leaves

SUN Jianping[1], LU Jiani[1,2], LI Xiaojun[2] , XUE Chenyang[2]

(1. *Municipal and Environmental Engineering College, Shenyang Jianzhu University*, Shenyang, 110168, China; 2. *Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences*, Shenyang, 110016, China)

Abstract: Foliar selenium spraying is an effective agronomic fortification to increase the selenium content of crops. Exploring the distribution, accumulation characteristics and influencing factors of selenium in rice leaf fractions can provide support for improving the utilization efficiency of foliar selenium application and reducing the ecological and environmental risks of selenium. This study compared the effects of different selenium forms, concentrations, treatment times and different surfactant carriers on the distribution and accumulation of selenium in the subcellular fractions of rice leaves using the leaf in vitro culture technique. The results showed that: (1) Selenium was mainly distributed in the cell wall of rice leaves, followed by chloroplast and

基金项目：黑土地保护与利用科技创新工程专项资助(XDA28090308)

第一作者：孙剑平（1977 -），博士，副教授，主要从事作物对硒的吸收积累原理等研究，（E-mail）sunjp1977@163.com。

***通信作者**：李晓军，博士，研究员，主要从事污染土壤生物修复原理与技术、作物对硒的吸收积累原理，（E-mail）lixiaojun@iae.ac.cn。

mitochondrial fractions, with the least in the cytosol. (2) The uptake capacity of sodium selenite in leaves within a few hours of leaf application of selenium fertiliser was significantly higher than that of nano-selenium, selenomethionine and yeast selenium, by 1.25-fold, 1.32-fold and 5.43-fold, respectively, and the migration capacity was about 1.26-fold higher than that of the remaining three. (3) The rice per The optimal amount of selenium applied to each leaf was 0.008 mg, at which time the selenium content in chloroplasts and mitochondria reached the maximum value. (4) 3-7 h after leaf application of selenium was the critical time point for selenium uptake and translocation in leaves. (5) Meanwhile, compared with cyclodextrins and alkylglycosides, the addition of rhamnolipids to exogenous selenium at a concentration of 30 $mg·L^{-1}$ promoted selenium uptake in rice leaves better, and the content of the absorbed content increased by 0.8-fold. The above results lay the foundation for the subsequent understanding of selenium transport mechanisms in leaves, and also provide support for the optimization of selenium formulations, the establishment of scientific selenium application systems, and the reduction of selenium ecological and environmental risks in the future.
Key words：selenium, rice, subcellular distribution, foliar spray, surfactant

硒是人类和动物必须的微量元素，人体缺硒会导致心脑血管病、高血压综合症等 40 余种病高发，动物缺硒会引起硒-维生素 E 缺乏症(Rayman, 2000)。植物是人类摄取硒的主要来源，通过生产富硒水稻等作物来提高人体硒摄入量是防止人类硒营养缺乏的有效途径(Wan et al., 2019)。目前，常用的农艺生物强化作物硒含量主要包括土壤添加硒肥和叶面喷施硒肥两种手段。与土壤施硒相比，叶面施硒可以提高硒的利用效率，因为土壤中硒的生物有效性受土壤性质如氧化还原电位、pH 和有机质等因素影响，而且亚硒酸盐对土壤铁氧化物、氢氧化物和有机质都具有很高的亲和力，导致硒在土壤中的生物利用度降低(Yang et al., 2022)。此外，硒很容易通过土壤径流浸出，污染地下水，造成潜在的环境风险与硒资源浪费(Lakin, 1972)。而叶面施硒具有更高的生物利用度，可以使硒直接接触植物叶片，通过叶角质层/气孔或水性孔隙后进入叶片，并输送至植物籽粒中(朱永官, 2003 ,王冰, 2012)，从而大大提高硒的生物利用率，降低硒污染环境的风险，因此，叶面施硒在农业领域得到了广泛应用。

现阶段，在农业生产方面叶面喷硒的吸收效果较差。Emese 等人指出，对胡萝卜叶施 100 $\mu g·mL^{-1}$的硒肥，转移到果实中硒的利用率仅在 10%左右，多数都截留在根部（2%）或叶片部位（50%~80%）(Kápolna et al., 2009)，所以要想提高籽实里的硒含量，只有增加施硒量或借助其他元素的协同作用方能实现。但如此一来，又可能会导致施硒过量造成的环境风险，所以探究硒的吸收与分布过程，对于实现精准施硒，提高吸收效率，保证硒含量安全，具有重要意义。

目前，探究硒的吸收与分布的研究多数集中在水稻、小麦等粮食作物中，且多用亚细胞分布的手段观察硒在植物叶片的具体分布位置(Li et al., 2018a, Hu et al., 2023)。但其中讨论的元素略微单一，如只研究了硒形态(Ding et al., 2015)、浓度(Wang et al., 2021)以及光照和温度(张联合等, 2012)等，并未将其综合分析，这难以为富硒水稻的生产提供充分的理论依据。浓度、元素形态和表面活性剂性质与含量都是影响元素叶片吸收和亚细胞分布的关键因素。无机硒和有机硒的结构和物理性质不同，叶片对其吸收效果也不尽相同(Ebrahimi et al., 2015)。同时作为叶面肥的重要组分，表面活性剂通过增加水溶液与叶片的接触面积，实现叶面肥在叶片疏水蜡质层表面黏附和滞留(Kovalchuk & Simmons, 2021)，从而增加叶面肥被叶片吸收的机会，是提高叶面肥植物叶片利用效率的有效成分。因此，有必要系统探究叶面

施硒过程中不同硒形态、浓度、时间以及硒肥载体对硒在植物叶片亚细胞组分中的分布和累积的影响。

本研究采用离体叶片培养方式，通过对水稻叶片叶施硒，拟探讨以下问题：（1）不同施硒形态，浓度以及时间对水稻叶片亚细胞组分中硒分布和累积的影响；（2）不同载体对水稻叶片中硒吸收和积累的影响。相关结果为农业生产中提高硒肥吸收效率、节约硒肥资源提供借鉴。

1　材料与方法

1.1　实验材料

水稻品种：香妃，粳型常规水稻，生育期 156 d 左右，株高 100~105 cm，根系发达，茎秆坚韧，高抗倒伏，不早衰，株型紧凑，分蘖力极强，抗病性强，高抗稻瘟病、稻曲病、纹枯病，千粒重 26.2 g，米质入口香甜，口感极佳。

试剂：亚硒酸钠（Na_2SeO_3，广州市华豫贸易有限公司）、硒代蛋氨酸（$C_5H_{11}NO_2Se$，源叶生物科技有限公司）、纳米硒（Se，西安瑞禧生物科技有限公司）、酵母硒（博尔森生物科技有限公司）、环糊精（$C_{42}H_{70}O_{35}$，国药集团化学试剂有限公司）、鼠李糖脂（$C_{58}H_{106}O_{22}$，西安瑞捷生物科技有限公司）、烷基糖苷（$C_{16}H_{32}O_6$，源叶生物科技有限公司）、EDTA（$C_{10}H_{16}N_2O_8$，BBI 生命科学有限公司）、二硫苏糖醇（$C_4H_{10}O_2S_2$，上海麦克林生化科技有限公司）、Tris（$C_4H_{11}NO_3$，北京索莱宝科技有限公司）、蔗糖（$C_{12}H_{22}O_{11}$，广州市华豫贸易有限公司）。

1.2　水稻培养

将水稻种子在 10%H_2O_2 溶液中消毒 30 min，用去离子水冲洗 3~5 次。清洗后种子放在 28 ℃植物培养箱中催芽 3~4 d 后移栽至育苗盘中，25 ℃培育 21 d，育苗盘中的土施加氮磷钾肥（尿素 91 $mg\cdot kg^{-1}$、过磷酸钙 200 $mg\cdot kg^{-1}$、氯化钾 40 $mg\cdot kg^{-1}$）保证足够营养。待水稻幼苗生长 21 d 后，将充分展开的第三叶从叶基部剪下，用于叶片亚细胞实验。

1.3　实验设计

水稻叶片离体实验可以将叶片作为一个独立的整体，研究外源物质的叶片吸收和迁移出叶片情况(张联合等, 2012, Chen et al., 2019)。因此，本文采用水稻叶片离体实验，将叶片沿叶舌剪下，放入 EDTA 溶液中，EDTA 溶液承接韧皮部渗出汁液，反映了叶片吸收硒后向其他器官迁移的情况。实验分别考虑施硒形态、浓度、时间及表面活性剂的影响。

1.3.1　施硒形态对硒叶片迁移积累的影响

选取水稻叶位一致、长势相同的叶片（第三叶），将筛选叶片的剪切部位下表面浸入 2 mL 25 $mmol\cdot L^{-1}$ EDTA 溶液中，上表面暴露空气中，暴露于空气中的叶片在中间固定位置施加 10 μL 浓度为 1 000 $mg\cdot L^{-1}$（以硒计） 亚硒酸钠、硒代蛋氨酸、纳米硒或酵母硒溶液，7 h 取出叶片（预实验证明 7 h 已对叶施硒吸收完全），用 6 mL 水冲洗叶片施硒部位，冲洗水和 EDTA 溶液留下待用，整个过程在避光条件下完成（EDTA 吸收韧皮部汁液须在黑暗处完成(Chen et al., 2019)。所有处理有三个重复。

1.3.2　施硒浓度对硒叶片迁移积累的影响

为使溶液以液滴的形式，施加在叶片同一位置（苗期叶片叶宽较窄），故提高施硒浓度，降低施硒体积。预实验证明施加浓度体积小时，较高浓度的硒不会对叶片造成损伤，见图 1。故实验设计为：在叶片固定位置施加 10 μL 浓度分别为 0、200、400、600、800、1 000 $mg\cdot L^{-1}$ 亚硒酸钠溶液，其它同 1.3.1。



图中圆圈为施硒部位。

The Circle in the picture is the place where selenium is applied.

图 1　施加 10 μL 1 000 mg·L^{-1} 亚硒酸钠溶液 7 h 后的叶片

Fig. 1　leaves after application of 10　μL 1 000 mg·L^{-1} disodium selenite solution for 7 h

1.3.3　施硒叶片硒的迁移积累特征

为使实验数据形成系统变化，故采用呈指数形式增长的时间梯度，且预实验中置于 EDTA 溶液中的叶片 28 h 不会失去生命体征，故实验设计为：在叶片固定位置施加 10　μL 1 000 mg·L^{-1} 亚硒酸钠溶液，在 0、1、2、3、5、7、9、14、28 h 取出叶片，其它同 1.3.1。

1.3.4　表面活性剂浓度和性质对叶片硒迁移积累的影响

选择的表面活性剂为常用且环境友好的环糊精、鼠李糖脂和烷基糖苷。根据表面活性剂的临界胶束浓度(李果等, 2011, 张茜, 2020)，分别配制环糊精浓度为 20、40、60、80、100 mg·L^{-1}；鼠李糖脂浓度为 10、20、30、40、50 mg·L^{-1}；烷基糖苷浓度为 20、40、60、80、100 mg·L^{-1}。将叶片放入 2 mL 25 mmol·L^{-1} EDTA 溶液中，在固定位置施加 10　μL 配制的含表面活性剂的亚硒酸钠溶液（Se，800 mg·L^{-1}），7 h 取出叶片，用 6 mL 蒸馏水冲洗叶片施硒部位，保存冲洗水用于样品分析。整个过程在避光条件下完成。所有处理有三个重复。

1.4　样品前处理和分析

叶片亚细胞组分分离方法：将冲洗干净的叶片擦干水分，亚细胞分离处理参照 Ying(Su et al., 2014)等人的方法。具体步骤如下：叶片加入 2 mL 提取剂，在 4 ℃条件下于瓷研钵中研磨。提取剂组成为：蔗糖（0. 25 mol·L^{-1}）　+ Tris-HCl（50 mmol·L^{-1} pH= 7.5　）+　二硫苏糖醇（1. 0 mmol·L^{-1}）。将研磨液移入 10 mL 离心管，用高速冷冻离心机 600 ×g、离心 10 min，沉淀物为细胞壁(F1)；将上清液移入 10 mL 离心管中，低温高速离心 1 000 ×g、离心 20 min，沉淀物为叶绿体(F2)；将上清液移入 10 mL 离心管中，低温高速离心 10 000 ×g、离心 20 min，沉淀物为线粒体(F3)，上清液为细胞液(F4)。

样品的消煮和测定方法：将实验中获得的 EDTA 溶液和分离出的亚细胞组分（F1-F4）参照 GB 5009.93-2017 进行消解。将称重的 EDTA、亚细胞组分移入坩埚中，加 10 mL（9+1）浓硝酸+高氯酸，盖上锅盖冷消化过夜。次日于电热板上加热，待黄烟散尽、溶液变为清亮透明并伴有白烟产生时，将电热板升温至 180 ℃加热至剩余体积为 1~2 mL。冷却，加 5 mL 50%盐酸溶液，继续在 80 ℃电热板上加热 1 min，取下用 1%柠檬酸定容至 25 mL 比色管中，静置一夜，取上清液于 10 mL 离心管中待测。将 1.3 实验中获得的冲洗水和上述待测液用原子荧光光谱仪(SK-2003A)测定。

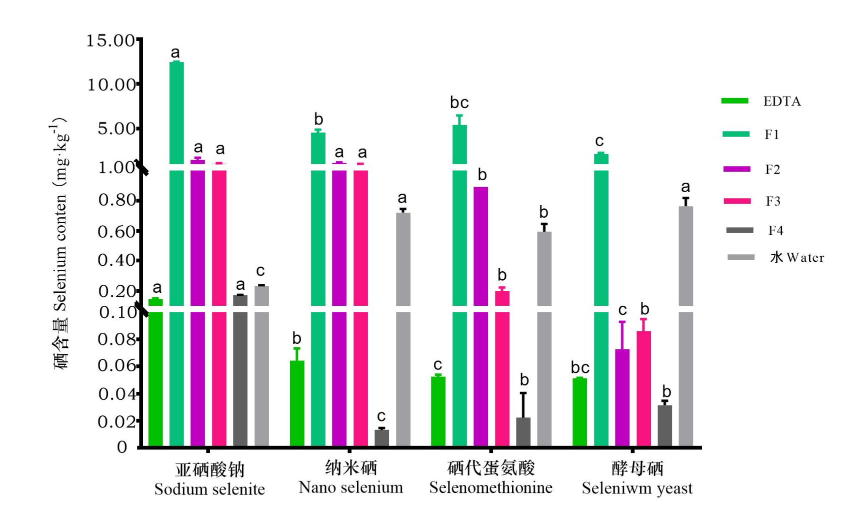
质量控制：消解过程中以标准物质(GBW10022 蒜粉)和消解液空白作为对照，消解过程与样品一致；测定过程中增加硒标准溶液测定的方法控制测样质量。

1.5　数据处理

采用 Microsoft Office Excel 2016 和 SPSS20. 0(IBM, USA)对试验数据进行数据统计分析，数据间比较采用单因素方差分析(One-way analysis of variances, ANOVA, LSD, $P < 0.05$)；图片采用 GraphPad Prism 9(GraphPad Software,USA)进行绘制。

2　结果与分析

2.1　不同硒形态对水稻叶片亚细胞组分中硒分布和累积的影响



F1. 细胞壁；**F2.** 叶绿体；**F3.** 线粒体；**F4.** 细胞液。小写字母代表不同处理间差异显著（P<0.05）。下同。

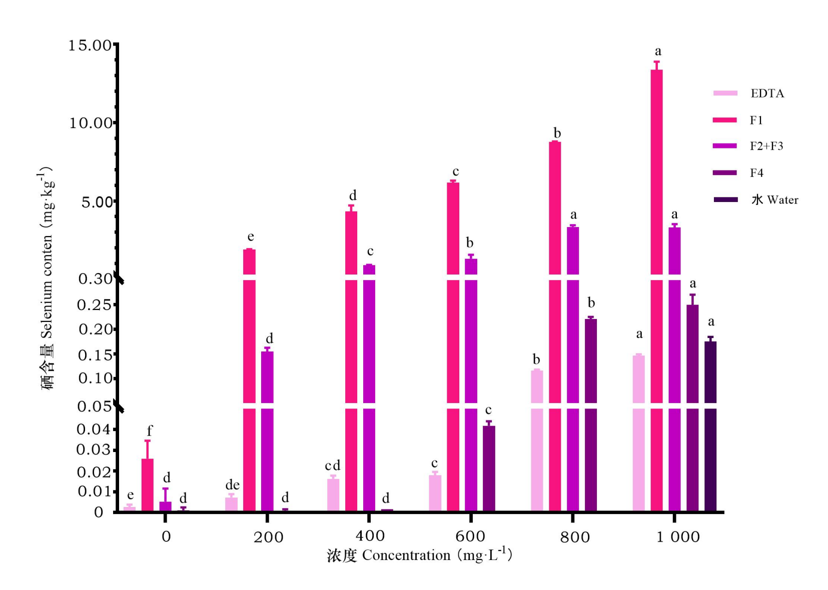
F1. Cell wall; **F2.** Chloroplast; **F3.** mitochondrial; **F4.** Cell fluid. Lowercase letters represent significant differences between treatments（P<0.05）. The same below.

图 2　施硒形态对水稻叶片硒亚细胞分布和积累的影响

Fig.2　Effects of selenium forms on subcellular distribution and accumulation of selenium in rice leaves

图 2 表示叶片施加硒肥数小时内不同施硒形态下水稻叶片硒的亚细胞分布和迁移特征。EDTA 中的硒含量表明了硒从叶片向水稻其它器官的迁移能力，叶片冲洗水中的硒表明外源硒的叶片残留，而 F1-F4 表示叶片中硒的亚细胞分布（以下部分相同）。可以看出硒形态不影响其在叶片中的亚细胞分布特征，硒含量均呈现细胞壁＞细胞器＞细胞液。但不同硒形态间的亚细胞分布存在显著差异：细胞壁中硒含量亚硒酸钠＞纳米硒＞硒代蛋氨酸＞酵母硒；在细胞器中亚硒酸钠≌纳米硒＞硒代蛋氨酸＞酵母硒，其中施用硒代蛋氨酸时细胞器中硒含量 F2＞F3，其它处理两者无显著差异；细胞液中硒含量亚硒酸钠＞硒代蛋氨酸≌酵母硒＞纳米硒。同时可以看出，亚硒酸钠处理 EDTA 溶液中硒含量显著高于其他三个处理，而其冲洗水中最少，酵母硒和纳米硒含量最高，这说明水稻叶片 7 h 已有相对较多的硒向其它器官迁移，水稻对亚硒酸钠的吸收和转运效率最高。

2.2　不同亚硒酸钠浓度对水稻叶片亚细胞组分中硒分布和累积的影响



0~800 mg·L^{-1} 冲洗水中硒未检出。

Selenium was not detected in 0 ~ 800 mg·L^{-1} of irrigation water.

图 3　施加浓度对叶片硒亚细胞分布和积累的影响

Fig. 3　Effects of different concentrations on subcellular distribution and accumulation of selenium in leaves

图 3 表示叶片施加硒肥数小时内在不同硒施加浓度下水稻叶片硒的亚细胞分布和迁移情况。从图中可以看出随着浓度的增加，叶片中细胞壁的硒含量呈持续上升趋势；每片叶片硒施加量为 0~0.008 mg 时，叶绿体和线粒体硒含量呈上升趋势，而后未发生显著变化；细胞液中硒浓度在 0.004~0.008 mg 时急速上升，而后上升缓慢。EDTA 中硒含量随着亚硒酸钠施用量的增加也显著提高，在 0.006 mg 到 0.008 mg 之间变幅最大；细胞壁也呈持续上升趋势，说明施加浓度越高，滞留在细胞壁内的硒含量越多，并且向其它器官转运的硒的速率相对稳定，大致均呈现上升趋势。叶表硒残留在硒施加量为 0.01 毫克每叶时才开始出现。

2.3　不同处理时间下水稻叶片亚细胞组分中硒分布和累积的变化

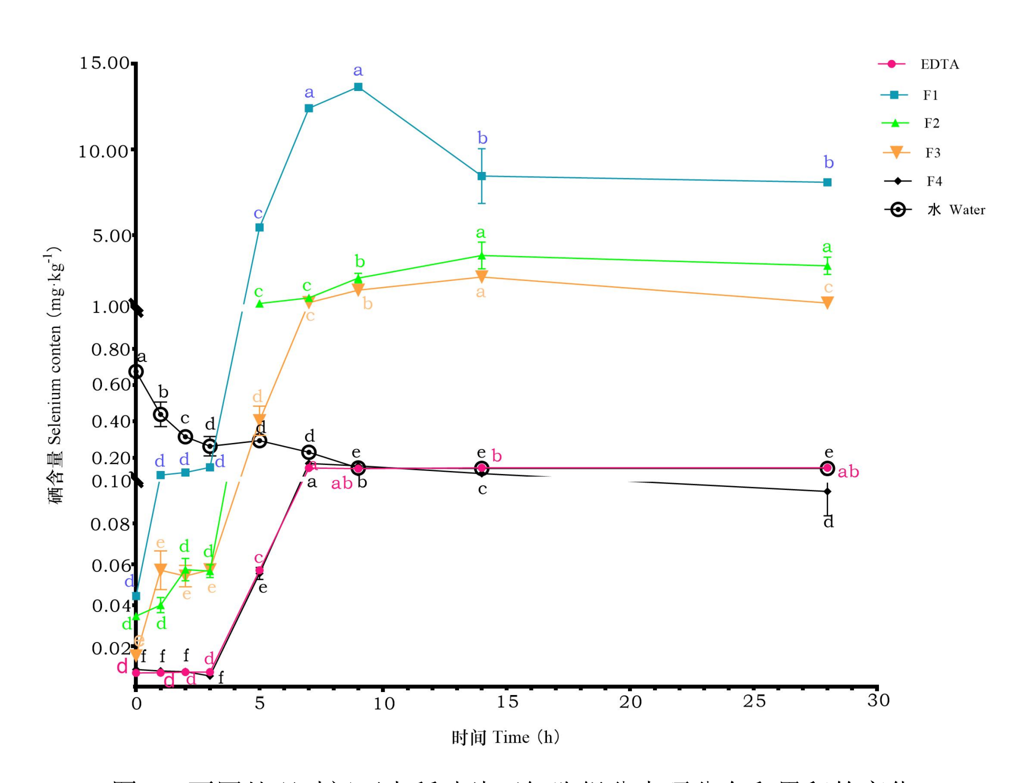


图 4　不同处理时间下水稻叶片亚细胞组分中硒分布和累积的变化

Fig.4　Changes of selenium distribution and accumulation in subcellular components of rice leaves under different treatments

图 4 表示施硒不同时间后水稻叶片硒残留、积累和迁移特征。在实验浓度下，叶表面会出现硒残留。水溶液残留硒在施用后迅速下降，3 h 后下降趋势变缓，9 h 后不再发生变化。而 EDTA 中的硒 3 h 后开始迅速上升，7 h 后无显著变化，这说明 7 h 叶片表面已经吸收完全，叶片内部也完成硒元素的迁移以及输送至其他器官的过程。在叶片内部，硒主要分布在细胞壁上，其次是叶绿体和线粒体，可溶性组分中硒含量极少。随着硒施用时间的增加，各亚细胞组分中硒含量均呈上升趋势：在 1~3 h 中稳定，3~7 h 迅速上升，7 h 后上升缓慢，9 h 后趋于稳定。

2.4　不同表面活性剂对水稻叶片亚细胞组分中硒分布和累积的影响

图 5-7 表示叶片施硒肥数小时内施加不同浓度的环糊精、鼠李糖脂和烷基糖苷对水稻叶片硒亚细胞分布的影响。可以看出，表面活性剂的施用不会改变硒主要分布在细胞壁中，细胞液分布最少的特征。由图 4 可知，施加环糊精浓度增加，F4 中硒含量显著增加，F1 未发生显著变化，F2+F3 中硒含量在 20 mg·L^{-1} 和 80 mg·L^{-1} 时取得最大值且 20 mg·L^{-1} 时与其他浓度存在显著差异，80 mg·L^{-1} 时与其他浓度无显著变化。由图 5 可知，随着鼠李糖脂浓度的增加，F1 和 F2+F3 组分均呈先上升后稳定趋势，均在 30 mg·L^{-1} 时取得最大值；F4 组分硒含量呈现缓慢上升趋势，在 40 mg·L^{-1} 时取得最大值。由图 6 可知，随着烷基糖苷浓度的增加，F1 中硒含量稳定，未受影响，F4 组分均呈现波动趋势且趋势大致相反；F2+F3 组分硒含量在 40 mg·L^{-1} 时取得最大值。对比三种表面活性剂最佳施用浓度及叶片内部硒含量，可以看出添加鼠李糖脂所用浓度较低、叶片内部硒含量最高，为三者中的最优选择。

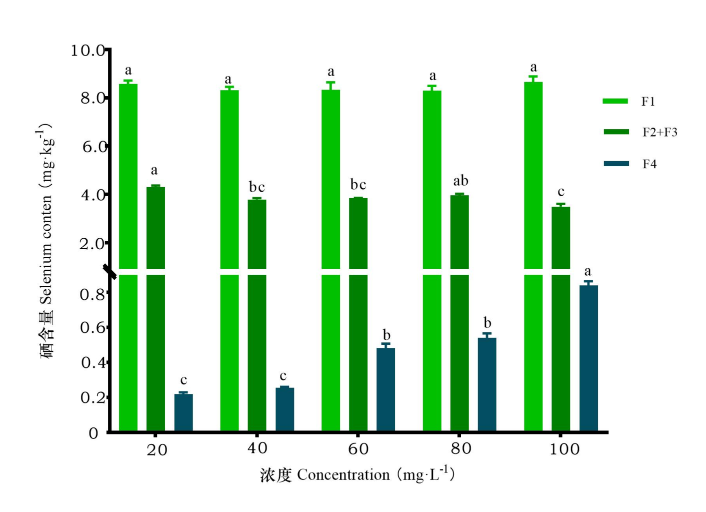


图 5　不同浓度环糊精下水稻叶片硒的亚细胞分布

Fig.5　Subcellular distribution of selenium in rice leaves with different concentrations of cyclodextrin

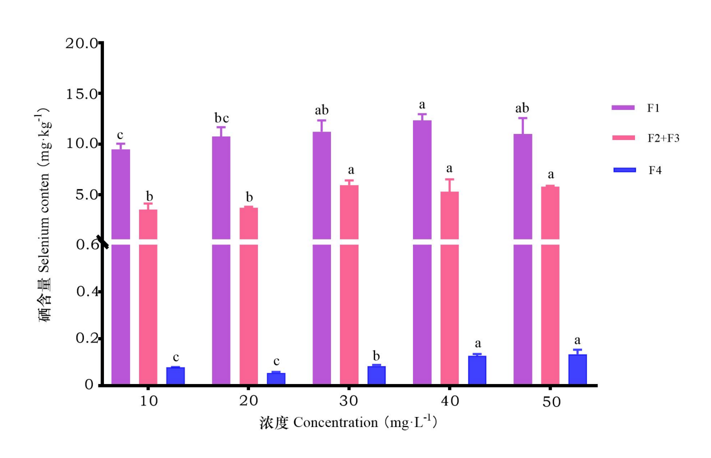


图 6　不同浓度鼠李糖脂对水稻叶片硒亚细胞分布情况

Fig. 6　Subcellular distribution of selenium in rice leaves treated with rhamnolipid of different concentrations

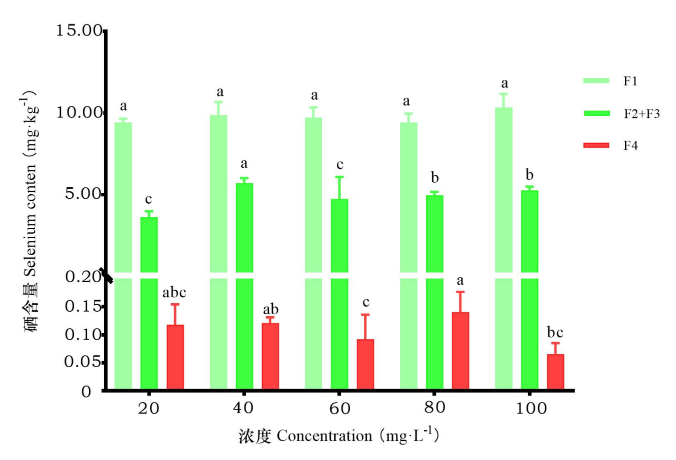


图 7 不同浓度烷基糖苷对水稻叶片硒亚细胞分布情况

Fig. 7 Subcellular distribution of selenium in rice leaves treated with different concentrations of alkyl glycosides

3 讨论与结论

硒进入叶片后，被植物吸收利用的效果，可以通过植物叶片上各亚细胞组分中硒的含量来观察(Zhu et al., 2020)。叶片亚细胞组分通过差速离心法提取，可分为细胞壁、叶绿体和线粒体以及细胞液。细胞壁是元素进入叶片的第一道屏障，可通过跨膜运动将所需营养元素输送到细胞器中。细胞器内包含叶绿体、线粒体等多种作物进行正常生理活动的场所。有研究表明，在植物细胞中叶绿体和线粒体因其复杂的代谢联系而被视为相互依赖的细胞器，例如进行新陈代谢、能量状态和还原/氧化状态时，叶绿体和线粒体起到了关键作用。存在于叶绿体和线粒体上的质基因很大程度上会参与籽粒中营养元素的合成，如蛋白质合成、酶激活、代谢物产生和电子传递链维护等(Li et al., 2018b)，由此可见叶绿体和线粒体是营养元素进入叶片后，转化成籽粒可用成分的重要组分。细胞液则是叶片细胞内的液态物质，包含了细胞中多种溶质和胞内器官，可以填充细胞内空间，为细胞器的功能提供支撑(Ceballos-Laita et al., 2015)。

施硒形态不同会影响作物叶片硒含量。在亚硒酸钠、硒酸钠、亚硒酸锌以及硒代蛋氨酸4 种硒形态中，水稻苗期叶片富集亚硒酸钠效果最佳，硒代蛋氨酸效果最差(施柳, 2021)。而孕穗期水稻功能叶硒含量积累硒酸钠＞亚硒酸钠＞纳米硒＞硒代蛋氨酸＞酵母硒(王亚萍, 2020)。本研究中叶片施加硒肥数小时内离体苗期水稻叶片硒积累量亚硒酸钠＞纳米硒＞硒代蛋氨酸＞酵母硒，与前两者结果相比，均表现为无机硒优于有机硒。从实验结果来看，施加亚硒酸钠和纳米硒后叶片细胞器中积累的硒含量显著高于硒代蛋氨酸和酵母硒，说明相比于有机硒，无机硒和纳米硒更易迁移至功能器官，被植物利用。这是因为无机硒和纳米硒具有良好的结合蛋白质或多糖的稳定性，更易进入叶片(Nie et al., 2023)，为籽实所利用。从细胞液、EDTA 和叶表面残留的硒含量来看，叶片对亚硒酸钠吸收和迁移能力显著高于其他三者，说明施加亚硒酸钠更易被水稻叶片吸收并输送到其他器官。

外源硒浓度显著影响亚细胞组分硒的积累。有研究表明，低浓度促进线粒体和细胞质中硒含量，高浓度则抑制；叶绿体中硒含量随着浓度的升高呈波动趋势，细胞壁则一直上升(Wang et al., 2010, 樊俊等, 2016)，这与本研究结果有所区别。本实验中，虽施加了高浓度的硒，但施加量为 10 μL，所以具体施加到叶片中的硒最高为 0.01 毫克每叶。随着外源硒浓度的增加，各亚细胞组分硒含量呈现上升趋势，当外源硒施加量高于 0.008 毫克每叶时叶绿体和线粒体不发生显著变化，说明每片叶子施加 0.008 mg 的亚硒酸钠已达到该水稻叶片细

胞器的吸收量。当施加量为 0.01 毫克每叶时，冲洗水中检测出 0.18 $mg \cdot L^{-1}$ 的硒，是施加量减去叶片内硒含量所残留的硒，此时叶片吸收硒达到饱和，不再吸收。综上所述，施加 0.008 mg 的亚硒酸钠为每片水稻叶片的最优施硒量，此时可最大程度的运用于叶绿体和线粒体等细胞器，为籽粒提供最适合的外源硒。

硒叶施后在叶片组分的分配特征变化反映了硒在叶片吸收、转化和迁移的规律。随着施硒时间的增加，各组分中的硒含量于 7 h 趋于稳定。EDTA 中的硒含量表明了硒向水稻其它器官的迁移能力，可以看到 0~3 h 未发生变化，从 3 h 后开始迅速上升，7 h 后无显著变化，这说明叶施硒的前 3 h，硒并未向其它部位迁移，而是集中在叶片内部；3~7 h 叶绿体、线粒体、细胞液以及 EDTA 中硒含量发生显著增加，说明在此时硒在叶绿体和线粒体等细胞器中完成籽粒所需的合成与转化，并开始向水稻其他部位迁移；7 h 后趋于稳定。说明在 3~7 h 是叶片吸收转化硒元素的最佳时间，这与已有结论：农田里要求肥喷施 6 h 内不能出现降雨，以免影响施肥效果一致。冲洗水中硒残留量同样说明 3~7 h 是叶施的硒在叶片中转化迁移的重要时期。

作为叶面肥的重要组分，表面活性剂属性和浓度均显著影响作物叶面肥的吸收效率。有研究证实表面活性剂低浓度可显著改变叶片表面性质，克服植物角质膜阻力，提高植物对叶面肥、生长调节剂、除草剂等渗透吸收利用率(Li et al., 2011)。所以找寻一种低浓度同时可以促进叶片对元素吸收的表面活性剂有利于节约硒肥施用。本研究对比了三种环境友好的生物表面活性剂——环糊精、鼠李糖脂和烷基糖苷。可以看出表面活性剂施加会使硒在细胞器内的含量发生变化：环糊精和烷基糖苷均产生波动变化，低浓度促进，高浓度抑制；鼠李糖脂则在 30 $mg \cdot L^{-1}$ 时取得最大值而后变化不明显。说明添加表面活性剂，会促使硒元素向功能器官迁移，促进叶片对硒的转化。三者施加量分别在 20、30、40 $mg \cdot L^{-1}$ 时实现硒的最高积累。对比三种表面活性剂在最佳浓度条件下的叶片硒含量时发现：鼠李糖脂更易促进外源硒进入叶片内部。这主要是因为添加表面活性剂会使溶液增溶，使其更易渗透到叶片中。而表面活性剂的 CMC 值（临界胶束浓度）越低，形成的胶束基团越多，胶束基团的体积也就越大，这样就会有更多的空间用于增溶(李果等, 2011)。鼠李糖脂的 CMC 值在 30~50 $mg \cdot L^{-1}$ 左右，小于烷基糖苷和环糊精（CMC 值在 100 $mg \cdot L^{-1}$ 左右）的临界胶束浓度，更易促进外源硒进入叶片，故鼠李糖脂为三者中的最优选择。

硒作为人体必需元素，摄入过少和过多均会产生不良反应，因此，如何科学合理安全摄入有效的硒是社会关注的热点和重点。对于富硒农产品生产而言，在不产生作物和生态毒性的情况下，尽可能高效利用外源硒生产达标农产品是该领域工作的焦点。本研究揭示了叶施硒肥数小时内水稻第三叶亚细胞分布积累和迁移特征：施加亚硒酸钠叶片对硒的利用效果最优，最佳施硒量为 0.008 毫克每叶，叶施硒后 3~7 h 是叶片合成籽粒所需硒的最佳时间，同时在外源硒中加入鼠李糖脂可以促进硒的吸收，更加减少外源硒的施用量，节约了硒资源，降低了环境风险。上述结果为后续了解硒在叶片中的迁移机制奠定基础，也为未来硒配方优化、科学施硒制度建立以及降低硒生态环境风险提供支撑。

参考文献

CEBALLOS-LAITA L, GUTIERREZ-CARBONELL E, LATTANZIO G, et al., 2015. Protein profile of Beta vulgaris leaf apoplastic fluid and changes induced by Fe deficiency and Fe resupply[J]. Front Plant Sci, 6: 145.

CHEN L, LIN Y, CHEN P, et al., 2019. Effect of iron deficiency on the protein profile of rice (*Oryza sativa*) Phloem Sap[J]. Chin Bull Bot, 54(2): 194-207.

DING Y, WANG R, GUO J, et al., 2015. The effect of selenium on the subcellular distribution of antimony to regulate the toxicity of antimony in paddy rice[J]. Environ Sci Poll Res, 22: 5111-5123.

EBRAHIMI N, HARTIKAINEN H, SIMOJOKI A, et al., 2015. Dynamics of dry matter and selenium accumulation in oilseed rape (*Brassica napus* L.) in response to organic and inorganic selenium treatments[J]. Agric Food Sci, 24: 104-117.

FAN J, WANG R, HU HQ, et al., 2016. Effect of selenate and selenite on selenium uptake and subcellular distribution in leaves of flue-cured tobacco[J]. Chin Tobacco Sci, 37(4): 37-41.[樊俊，王瑞，胡红青，等，2016. 烟株对 Se(Ⅵ)和 Se(Ⅳ)的吸收及叶片硒亚细胞分布[J]. 中国烟草科学，37(4)：37-41.]

HU C, NIE Z, SHI H, et al., 2023. Selenium uptake, translocation, subcellular distribution and speciation in winter wheat in response to phosphorus application combined with three types of selenium fertilizer[J]. BMC Plant Biol, 23(1): 224.

KáPOLNA E, HILLESTRøM P R, LAURSEN K H, et al., 2009. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot[J]. Food Chem, 115(4): 1357-1363.

KOVALCHUK N M, SIMMONS M J, 2021. Surfactant-mediated wetting and spreading: Recent advances and applications[J]. Current Opinion Colloid Interface Sci, 51: 101375.

LAKIN H W, 1972. Selenium accumulation in soils and its absorption by plants and animals[J]. GSA Bull, 83(1): 181-190.

LI G, MAO HJ, GONG ZQ, et al., 2011. Solubilization of diesel and polycyclic aromatic hydrocarbons by certain kinds of surfactants[J]. Res Environ Sci, 24(7): 775-780.[李果，毛华军，巩宗强，等，2011. 几种表面活性剂对柴油及多环芳烃的增溶作用[J]. 环境科学研究，24(7)：775-780.]

LI H, JI G, WANG Y, et al., 2018a. WHITE PANICLE3, a novel nucleus-encoded mitochondrial protein, is essential for proper development and maintenance of chloroplasts and mitochondria in rice[J]. Front Plant Sci, 9: 762.

LI H, JI G, WANG Y, et al., 2018b. WHITE PANICLE3, a novel nucleus-encoded mitochondrial protein, is essential for proper development and maintenance of chloroplasts and mitochondria in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 9:762.

LI X, YUE C, WANG B, et al., 2011. Effect of surfactant on boron absorption of soybean and peanut plants[J]. Guizhou Agric Sci, (7) : 107-111.

NIE X, YANG X, HE J, et al., 2023. Bioconversion of inorganic selenium to less toxic selenium forms by microbes: A review[J]. Front Bioengin Biotechnol, 11: 1167123.

RAYMAN MP, 2000. The importance of selenium to human health[J]. The lancet , 356: 233-241.

SHI L, 2021. Effects of foliar application of selenium on arsenic accumlation characteristics in rice[D]. Shenyang: Shenyang University: 241-313.[施柳，2021. 叶面施硒对水稻中砷积累特征的影响[D]. 沈阳：沈阳大学：241-313.]

SU Y, LIU J, LU Z, et al., 2014. Effects of iron deficiency on subcellular distribution and chemical forms of cadmium in peanut roots in relation to its translocation[J]. Environ Exp Bot, 97: 40-48.

WAN Y, WANG K, LIU Z, et al., 2019. Effect of selenium on the subcellular distribution of cadmium and oxidative stress induced by cadmium in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Environ Sci Poll Res, 26: 16220-16228.

WANG B, 2011. Researeh on the penneability of cutieleand sereening for efficient surfaetant[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University: 31-126.[王冰，2011. 植物角质膜渗透性的研究以及高效表面活性剂的筛选[D]. 郑州：郑州大学：31-126.]

WANG C, LI B, LI H, et al., 2010. Effects of Se, Zn and their interaction on the subcellular distribution of selenium in spring tea leaves[J]. Acta Hortic Sin, 37(5): 794-800.

WANG K, WANG Y, WAN Y, et al., 2021. The fate of arsenic in rice plants (*Oryza sativa* L.): Influence of different forms of selenium[J]. Chemosphere, 264: 128417.

YANG H, YANG X, NING Z, et al., 2022. The beneficial and hazardous effects of selenium on the health of the soil-plant-human system: An overview[J]. J Hazardous Mat, 422: 126876.

WANG YP, 2020. Effects of exogenous selenium biological fortification method on rice selenium enrichment and selenium forms in grain[D]. Nanning: Guangxi University: 132-209.[王亚萍，2020. 外源硒施用方式对水稻富硒及稻米硒形态的影响[D]. 南宁：广西大学：132-209.]

ZHANG LH, ZHAO W, YU FY, et al., 2012. Physiological characteristics of selenium uptake by excised leaves of rice[J]. J Soil Sci, 49(1): 189-193.[张联合，赵巍，郁飞燕，等，2012. 水稻离体叶片吸收亚硒酸盐的生理特性[J]. 土壤学报，49(1)：189-193.]

ZHANG Q, 2020. Synthesis of amphiphilic hydroxypropyl-β-cyclodextrin and it paclitaxel-loaded micelles[D]. Harbin: Northeast Forestry University: 23-131.[张茜，2020. 两亲性羟丙基-β-环糊精的合成与载紫杉醇胶束研究[D]. 哈尔滨：东北林业大学：23-131.]

ZHU J, ZHAO P, NIE Z, et al., 2020. 1 Selenium supply alters the subcellular distribution and chemical forms of cadmium and the expression of transporter genes involved in cadmium uptake and translocation in winter wheat (*Triticum aestivum*)[J]. BMC Plant Biol, 20: 1-12.

ZHU YG, 2003. Micro-interfacial processes in soil-plant systems and their environmental impacts[J]. J Environ Sci, 23(02): 205-210. [朱永官，2003. 土壤-植物系统中的微界面过程及其生态环境效应[J]. 环境科学学报，23(02)：205-210.]